

RT-PCRによる植物ウイルスの検出

植草秀敏・野村 研・北 宜裕

Detection of Plant Viruses by RT-PCR

Hidetoshi UEKUSA, Ken NOMURA and Nobuhiro KITA

摘 要

RT-PCRを用いた簡便で迅速な植物ウイルスの検出法について検討し、キュウリモザイクウイルス(CMV)、カブモザイクウイルス(TuMV)、トマト黄化えそウイルス(TSWV)において、感染葉片を蒸留水に浸漬しただけの溶液からウイルスの検出が可能な葉片浸漬法を開発した。次に、複数のウイルスに重複感染した植物体から抽出した全RNAを鋳型にして、複数の特異的プライマーを組み合わせたマルチプレックスPCR法を適用したところ、ダイコン-CMV・TuMVの系、ヤマユリ-CMV・チューリップモザイクウイルス(TBV)・ユリ潜在ウイルス(LSV)の系において、それぞれ重複感染ウイルスを検定することができた。さらに、汁液接種ができず、師部局在性でウイルス濃度が低く、免疫学的手法による検出も非常に困難なキュウリ黄化ウイルス(BPYV)について、BPYVゲノムのHSP70様タンパク質遺伝子部分に設計したプライマー組み合わせを用いてRT-PCRを行ったところ、安定してウイルスの検出が可能となることを明らかにした。なお、この場合、本プライマー組み合わせは、ウイルスゲノムからの予想増幅産物とはサイズが異なる宿主由来のDNA増幅産物が得られるものの、これにより感染植物からのRNA抽出の成否を判定できるマーカーとしても利用できることが示唆された。以上の知見よりRT-PCRは農業現場に即した簡便で迅速なウイルス検定法となり得ることが示された。

謝 辞

本報告を作成するにあたり、独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター病害防除部病害防除システム研究室長本田要八郎博士にご校閲の労をとっていただいた。ここに記して感謝の意を表する。

キーワード：RT-PCR、マルチプレックスPCR、CMV、TSWV、TuMV、TBV、LSV、BPYV(CuYV)

Summary

We examined the convenient and quick way for detection of the plant viruses and developed a new "leaf-dipping method", by which the cucumber mosaic virus (CMV) and tomato spotted wilt virus (TSWV) could be detected simply from the solution dipping the infected leaves of the host plant in distilled water without extraction of their RNA. Next we examined the detection of various viruses from the host plant with their multiple infections and could identify the individual virus from the mixed virus systems of the Japanese radish-CMV and TuMV system, and golden-banded lily-CMV, tulip breaking virus (TBV) and lily symptomless virus (LSV) system by applying the multiplex-PCR method with total RNA extracted from the host plant as a template using a combination of multiple specific primers. We further demonstrated that the beet pseudo yellow virus (BPYV), which is impossible to detect it by the bioassay because of its inability of sap-infection and difficult to detect it by the immunoassay because of its low concentration due to its limited localization at the phloem, could be stably identified using the RT-PCR with the primer designed to detect the gene coding to the HPS70-like protein on the BPYV genome. In this case, the amplified DNA products different in their sizes from the ones predicted from the virus genome were obtained with a combination of the primers used in the present study. It was suggested, however, that these primers could be utilized as the markers for justification of whether the RNA extracted from the host plant are successful or not. These findings indicate that the RT-PCR method provides convenient and rapid diagnostic means for detecting viruses to meet the needs of the agricultural field.

Keyword: RT-PCR, multiplex PCR, CMV, TSWV, TuMV, TBV, LSV, BPYV(CuYV)

緒 言

植物のウイルス病は、発病後の防除手段が限られているので、効率的な予防手段を講ずるために診断・同定や発生生態の把握が不可欠である。実際に、生産者や農業改良普及員からのウイルス病診断及び病原ウイルスの同定依頼は多い。しかし、その検査には、数種の植物を用いた生物検定やウサギ・マウス等の抗ウイルス抗体を用いた免疫学的診断など、時間と労力が必要となる。また、これらの方法では検定できないウイルスも多く、迅速・簡易で確実なウイルス検定法の開発が求められている。このような状況の中で、近年、RT-PCRを用いた植物ウイルス病の遺伝子診断技術が開発され、信頼性が高く確実な方法として実用化されつつある。本法は、上記の検定法で問題となる部分を補い、さらに今後は、植物ウイルスの主な検定法となるものと期待されている(佐野1990, 大貫・花田1996)。RT-PCRは、効率的な遺伝子単離手法としてLeeら(1988)によって開発された手法で、mRNAを鋳型にした逆転写によりcDNAを合成した後、そのcDNA内部の特定領域に作製した1組の特異プライマーを用いて、PCRにより目的とするcDNA断片を増幅・単離する手法である。ほとんどの植物ウイルスはゲノムがRNAからなるので、本法を用いれば、宿主植物からウイルスゲノムの特異的配列を増幅することで検出が可

能となる。本法では、逆転写及びその後のPCR段階で用いるプライマーの設計がポイントで、目的となるウイルス遺伝子の塩基配列を解析したり、データベースにあるウイルス遺伝子の塩基配列をもとに、配列特異性の高いプライマーを設計する手法が一般的に適用されている(今西・宮崎2001, 池尾2001)。しかし、RT-PCRの操作には複雑な過程が必要であり、まだ現場で対応できる技術には至っていない。そこで、本研究では、RT-PCRによる簡便で迅速な植物ウイルスの検出法について検討を行った。

まず、RT-PCRの操作において、最も複雑なRNA抽出過程をどこまで簡易化できるかについて、キュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*; CMV)を中心に検討した。次に、植物のウイルス病は多くの場合、重複感染することで被害が大きくなり、加えてその病害対策のための解析が複雑であり、かつ時間を要する。そこで、重複感染した植物を1回の検定で診断できるマルチプレックスPCR(Chamberlainら1988, Hauserら2000)について、ダイコン-CMV・カブモザイクウイルス(*Turnip mosaic virus*; TuMV)の系及びヤマユリ-CMV・チューリップモザイクウイルス(*Tulip breaking virus*; TBV)・ユリ潜在ウイルス(*Lily symptomless virus*; LSV)の系を用いて検討した。さらに、汁液接種による生物検定ができず、師部局在性でウイルス濃度が低いため、免

第1表 本研究で作製したプライマーの塩基配列と参照した登録塩基配列

本研究に用いたプライマー				参照した登録塩基配列			
ウイルス名	プライマー名	塩基配列	塩基数	登録番号	系統	報告者	引用文献
CMV	cmv-U924	5' - GAGCAAACAAAACCGTCAGC -3'	20	D42079	C7-2	Chauaplukら	未発表
	cmv-L924	5' - TCAACAGGGAGTAAGAGGAA -3'	20	D42080	E5	Chauaplukら	未発表
				D10538	Fny	Owenら	Owenら 1990
				S57834	Kin	Boccardら	Boccardら 1993
				L36251	Kor	Kimら	未発表
				D16405	legume	Karasawaら	未発表
				D10539	M	Owenら	Owenら 1990
				D49496	M48	Wuら	未発表
				D28780	NT9	Hsuら	未発表
				D00385	0	Hayakawaら	Hayakawaら 1989
				D12499	Y	Nittaら	Nittaら 1988
TSWV	tswv-U919	5' - TCGAGAGGTAATCCATAGGC -3'	20	X94550	LC	Guerra-Sanzら	未発表
	tswv-L919	5' - AAGAATCGTCAGAGCATAAT -3'	20	D00645	CPNH9	Citationら	Citationら 1990
				D00821	L3	Maissら	Maissら 1991
				AF020660	D	Qiuら	未発表
				Z36882	Italy	Vairaら	Vairaら 1995
TuMV	tumv-3-U	5' - TTAACAGACGAGCAAAGCA -3'	20	AF312910	KD	野村ら	未発表
	tumv-3-L	5' - CTCCTGTTCTACCGTTGT -3'	20				
LSV	lsv-U218	5' - TTTGCTCGTGTCTAATTGC -3'	20	X15343	-	Memelinkら	未発表
	lsv-L218	5' - CYTGWGCTGGTCTTGATTGC -3'	20	D43801	-	Takamatsuら	Takamatsuら 1994
				U43905	-	Kimら	未発表
				AF015286	Korean	Ryuら	未発表
TBV	tbv-U256	5' - CAAATGTAATGGCGTGTGG -3'	20	S60804	-	Dekkerら	Dekkerら 1993
	tbv-L256	5' - GCTGGCGTGCCTGAAGTAC -3'	20	S60805	-	Dekkerら	Dekkerら 1993
				S60806	-	Dekkerら	Dekkerら 1993
				S60808	-	Dekkerら	Dekkerら 1993
				S60810	-	Dekkerら	Dekkerら 1993
BPYV	bpyv-U126	5' - AGTGTCTTTGGGTGTTCA -3'	19	Y15568	-	Couttsら	未発表
	bpyv-L126	5' - ACGACGACTTTGGGTGTC -3'	19	U67447	-	Tianら	Tianら 1996
	bpyv-U127	5' - ACGATGGTTGGTGTGACG -3'	20				
	bpyv-L127	5' - GGTACTTTGAGACGGAATAA -3'	20				

疫学的手法による検出も難しいキュウリ黄化ウイルス (*Beet pseudoyellows virus*; BPYV) (Yamashitaら 1979, Liu and Duffus 1990) についても, RT-PCRによる検出を試みた。

材料及び方法

1. 植物及びウイルス

簡易なRT-PCRによる検出の検討には, 当所で保存しているCMV-黄斑系(CMV-Y)を用いた。CMVの増殖及びRT-PCRによる検出法の検討にはタバコ 'キサンチNN' を用いた。また, CMVゲノムRNAはポリエチレングリコール分画遠心法により精製したCMV粒子を用いて, フェノールSDS法により精製し, 260nm及び280nmの吸光度よりRNA濃度を測定した。この他に簡易なRT-PCRの検討のために, トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV, 県内トマトからの分離株) とその宿主植物としてトマト 'サンロード', ニューギニアインパチェンス及びキクを用いた。

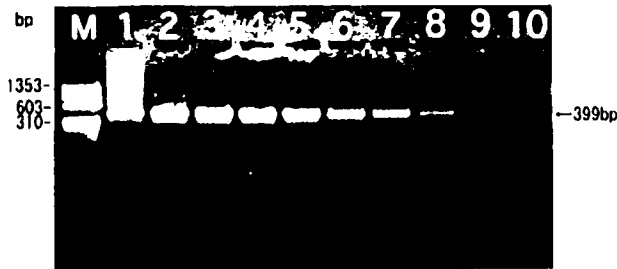
重複感染検定のためのマルチプレックスPCRの検討には, 当所圃場でモザイク斑を生じたダイコン '耐病総太り' と CMV・TuMVの系並びに当所雑木林に自生

するヤマユリ及び当所圃場に移植しウイルス症状を発症したヤマユリとCMV・TBV・LSVの系を用いた。

メロン及びキュウリ黄化病の病原ウイルスであるBPYVのRT-PCRによる検出には, メロン '久留米交配4号' とキュウリ 'なおよし' を用い, グロスチャンパー内で栽培した健全な個体と当所圃場で栽培し, 明りょうな黄化症状を示す個体をそれぞれ用いた。

2. ウイルス検出用プライマーの設計

本研究で作製したプライマーについて第1表にとりまとめた。CMV検出用のプライマーは, GeneBankに登録されている塩基配列情報データベース中よりCMVの11系統を選び, 遺伝子解析用コンピューターアプリケーションGENETYX™を用いて相同性解析を行い, 外被タンパク質(CP)遺伝子の上流にある非構造遺伝子部分で保存性の高い塩基配列に, PCRプライマー解析用コンピューターアプリケーションOLIGO™を用いてプライマーを作製した。同様にTSWVについては7種類の, TBVについてはユリ系統及びLSVについては4種類のCP遺伝子領域で保存性の高い部位にプライマーを作製した。TuMVについては当所のダイコンより分離し, 当所で塩基配列を決定したCP遺伝子部分(AF312910)にプラ



第1図 CMV RNAを鋳型として用いて行ったRT-PCRにより増幅されたDNA断片のアガロース電気泳動像

レーン左から分子量サイズマーカー(ϕ X174/*Hae*IIIマーカー)、続いてCMV RNA濃度を1ng, 0.1ng, 10pg, 1pg, 0.1pg, 10fg, 1fg, 0.1fg, 10ag, 1agとしたときのRT-PCR産物を示す。RT-PCRは50 μ l容量のスケールで行った。CMV検出のDNA増幅産物のサイズは399bp(矢印)



第2図 CMV感染タバコ葉からのRNA抽出処理方法の違いがRT-PCRに及ぼす影響

CMV感染タバコ葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬した溶液(1)、CMV感染タバコ葉片を100 μ lの蒸留水に浸漬し、98°Cで5分間加熱した溶液(2)、CMV感染タバコ葉片を10 μ lの蒸留水で磨砕した溶液(3)、1~3の溶液からそれぞれエタノール沈殿によりRNAを回収した溶液(4, 5, 6)、1~3の溶液をフェノールクロロフォルム処理して、たんばく質等を除去した後、エタノール沈殿によりRNAを回収した溶液(7, 8, 9)、CMV感染タバコ葉片からRNA抽出キットにより抽出したRNA溶液(10)。M: ϕ X174/*Hinc* IIマーカー。CMV検出のDNA増幅産物のサイズは399bp(矢印)。



第3図 CMV感染タバコ葉から各種RNA抽出溶液の段階希釈によるRT-PCR産物のアガロース電気泳動像

A:CMV感染タバコ葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬した溶液(1)、CMV感染タバコ葉片を100 μ lの蒸留水に浸漬し98°Cで5分間加熱した溶液(2)、2の溶液を10倍希釈(3)、100倍希釈(4)及び1000倍希釈(5)。B:CMV感染タバコ葉片を100 μ lの蒸留水で磨砕した溶液(1)、1の溶液を10倍希釈(2)、100倍希釈(3)、1000倍希釈(4)及び10000倍希釈(5) C:CMV感染タバコ葉片を100 μ lの蒸留水に浸漬した溶液(1)、1の溶液を5倍希釈(2)、10倍希釈(3)、100倍希釈(4)及び1000倍希釈(5)。CMV検出のDNA増幅産物のサイズは399bp(矢印)。いずれもMは ϕ X174/*Hinc* IIマーカーを示す。

イマーを作製した。また、BPYVについては、そのゲノム配列内のヒートショックタンパク質70様(*HSP70*homolog)塩基配列内に特異的プライマーを作製した(Tianら1996)。各ウイルスに対するプライマーは19~20塩基対のものを数種類作製し、最終的にそれらのうち最も検出感度の高かったプライマー組み合わせを選んで検出に用いた。なお、プライマーの合成は、宝酒造株式会社のカスタマーサービスに委託した。

3. RT-PCR

すべての操作に用いた水は蒸留水(ミリQ水)にジエチルピロカーボネートを0.1%添加し、オートクレーブにより滅

菌したものを用いた。感染植物からのウイルスRNAの抽出は、基本的にRNA Isolation Kit(STRATA GENE社製; グアニジウムチオシアネート法)を用いた。RNA抽出の簡素化を検討するために、このキットのプロトコルを簡略化して得られたRNA抽出液あるいはこの過程を省略して2mm角の葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬しただけの溶液をRT-PCRに供試した。RT-PCRは、RNA PCR kit(AMV)ver.2.1(宝酒造)を用い、GeneAmp™ PCRシステム(パーキンエルマー社)で実施した。TSWVの検出には上流プライマーを用いて、それ以外のウイルスの検出には下流プライマーを用いて、まず、逆転写反応(42°C, 30分)を

行い、PCRに移行する前に99°Cで5分間処理して逆転写酵素を不活化した。続くPCR反応にはそれぞれ対のプライマーを加え、30~35サイクル反応させた。アニーリング温度は、OLIGO™を用いてそれぞれのプライマーと鋳型とで最適な温度に設定した。RT-PCR産物はアガロースゲル(1~1.5%)電気泳動により分画し、分子量サイズマーカー(ϕ X174/*Hinc* II及び ϕ X174/*Hae* III)と比較することにより増幅されたDNA断片長を確認した。

4. 増幅されたDNA断片の塩基配列の決定

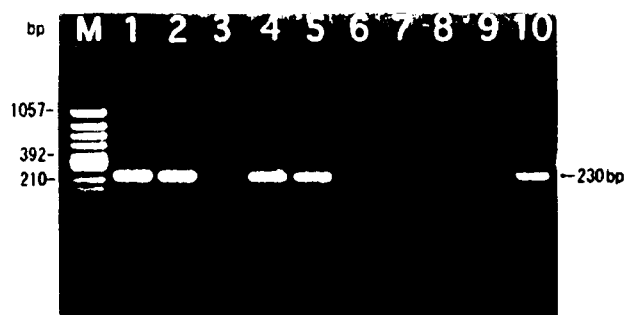
増幅されたDNA断片を電気泳動後にゲルを切り出して、スピнкаラムを用いて精製後、この断片を直接鋳型として、ダイデオキシシクルシークエンス法によりDNAシークエンスABI373S(エービーアイ)を用いて決定した。

結 果

1. 簡易RT-PCRの検討

簡易検定に用いるために設計したプライマーが、どの程度の濃度であればウイルスRNAの検出が可能であるかを調べるために、精製したCMVゲノムRNAを蒸留水に段階希釈し、RT-PCRに供試した。1ngから1agまで10分の1ずつ量を変えて行った結果、CMVのRNAは0.1fgまで検出され、RT-PCRを50 μ l容量のスケールで行う場合にRNA100分子程度で検出が可能であると考えられた(第1図)。

このプライマーを用いてCMV感染タバコからの簡易RT-PCRによる検出を試みた。CMV感染タバコ葉からRNA抽出キットのプロトコールに準じて抽出し、1 μ g/ μ l以下の濃度に調製したRNA溶液、キットのプロトコールからフェノール抽出を省略して抽出し、1 μ g/ μ l以下の濃度に調製したRNA溶液、明りょうな病徴を示す感染葉からメスを用いて2mm角に切り出した葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬した溶液、同じ葉片浸漬液を95°Cで10分間処理した溶液及び2mm角に切り出した葉片を10 μ lの蒸留水中でガラス棒を用いて軽く磨砕した溶液について、それぞれ1 μ lを用いて50 μ l容量のスケールでRT-PCRを行った。その結果、RNA抽出キットのプロトコールに準じて抽出したRNA溶液及び葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬しただけの溶液で目的の増幅DNA産物が検出された。また、葉片を100 μ lの蒸留水に浸漬し、98°Cで5分間加熱した溶液からも目的の増幅DNA産物が検出される場合があったが量は少なく、検出結果は不安定であった。これ以外の溶液については、目的の大きさのDNA断片が増幅されなかった(第2図)。供試した溶液に含まれるRNA濃度が高すぎたためと思われた



第4図 異なる植物のTSWV感染葉から各種RNA抽出溶液によるRT-PCR産物のアガロース電気泳動像

トマト(1)、ニューギニアインパチェンス(2)及びキク(3)の葉片をそれぞれ10 μ lの蒸留水に浸漬した溶液、トマト(4)、ニューギニアインパチェンス(5)及びキク(6)の葉片をそれぞれ100 μ lの蒸留水に浸漬し98°Cで5分間加熱した溶液、トマト(7)、ニューギニアインパチェンス(8)及びキク(9)の葉片をそれぞれ10 μ lの蒸留水で磨砕した溶液及びトマト葉片を切り出したメスを水洗した溶液(10)。Mは ϕ X174/*Hae* III サイズマーカーを示す。TSWV検出のDNA増幅産物のサイズは230bp(矢印)。

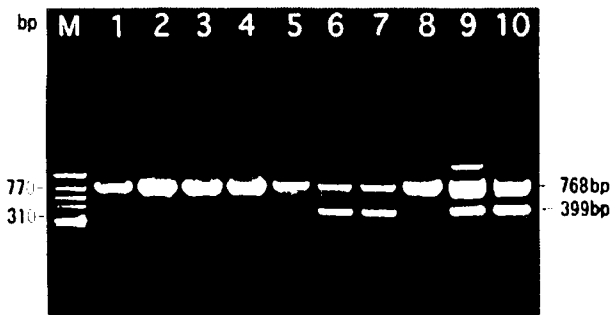
ので、10倍ずつ段階希釈して再度RT-PCRを行ったところ、98°Cで5分間処理した溶液と葉片を磨砕した溶液では、希釈することで目的の増幅DNA産物が検出されるようになった。しかし、希釈倍率が高くなるに従い増幅DNA産物の量が少なくなった(第3図)。これと比較して、葉片を100 μ lの蒸留水に浸漬した溶液では1000倍に希釈しても安定して増幅DNA産物が検出された(第3図)。

次に、他の植物-ウイルスの系においても葉片浸漬法でウイルスの検出が可能かどうかを検討するため、TSWVに感染したトマト、ニューギニアインパチェンス及びキクを用いてRT-PCRを行った。病徴を示す葉から2mm角に切り出した葉片を10 μ lの蒸留水に浸漬し、その溶液から1 μ lをとり、50 μ l容量のスケールでRT-PCRを行った。その結果、TSWVの感染したトマト及びニューギニアインパチェンスからは目的の増幅DNA産物が検出されたが、キクからは検出されなかった(第4図)。

2. マルチプレックスPCRによるウイルス重複感染植物の検定

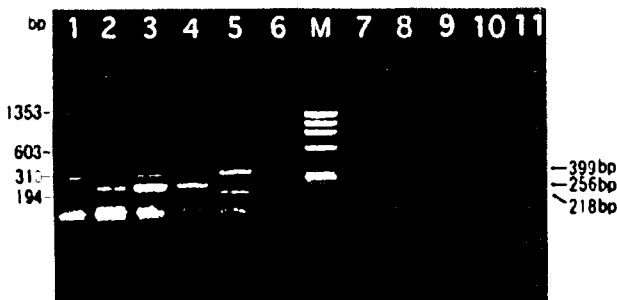
1回のPCR反応で、複数の目的遺伝子が増幅できるマルチプレックスPCRを用いて、複数のウイルスに重複感染している植物からウイルスを検出するため、マルチプレックスRT-PCRを試みた。ウイルスの検出作業に入るまえに、マルチプレックスPCRに用いる各プライマー組み合わせと鋳型となるウイルス遺伝子の塩基配列について、OLIGO™を使って解析し、各プライマーの特異性に問題がないかを確認した。

まず、当所ダイコン圃場より、モザイクあるいは軽度



第5図 ダイコンにおけるマルチプレックスPCR法を用いたキュウリモザイクウイルス(CMV)とカボチャモザイクウイルス(TuMV)の重複感染の検定

レーン1~10は圃場より葉にウイルス症状の認められるダイコン10株を回収し、葉片浸漬法でRT-PCRを行った。Mは ϕ X174/Hinc II サイズマーカーを示す。CMV検出のDNA増幅産物のサイズは399bp(矢印)、TuMV検出のDNA増幅産物のサイズは768bp(矢印)。



第6図 ヤマユリからの感染ウイルスのマルチプレックスRT-PCRによる検定

レーン1~6は当初は場移植ヤマユリからの検定結果で、レーン左からCMVの単独感染(1)、TBVとLSVの重複感染(2)、CMVとTBVの重複感染(3)、TBVの単独感染(4)、CMVとLSVの重複感染(5)及び未感染(6)。レーン7~11は葵山自生の無病徴ヤマユリからの検定結果。Mは ϕ X174/Hae III サイズマーカーを示す。CMV検出のDNA増幅産物のサイズは399bp(矢印)、TBV検出のDNA増幅産物のサイズは256bp(矢印)及びLSV検出のDNA増幅産物のサイズは218bp(矢印)。

のえそ症状を示す葉を回収して、全RNAを抽出し、CMV検出用とTuMV検出用プライマーを用いてマルチプレックスRT-PCRを行った。その結果、病徴を示すすべての葉からTuMVが検出され、そのうちの3割からはCMVも同様に検出された(第5図)。これはELISAによる検定結果とも一致した(データ不掲載)。

次に、当所雑木林に自生するヤマユリについて、当所圃場へ春に移植したところ、秋にはすべての株にモザイク症状が認められたので、これら罹病個体に対して、県内のヤマユリで発生が見られる主な3種類のウイルス(CMV, TBV, LSV)の検出用プライマーを用いたマルチプレックスRT-PCRを適用した。モザイク症状を生じたヤマユリからはCMVあるいはTBVの単独感染、またTBVとLSV, CMVとTBVあるいはCMVとLSVの重複感

染結果が得られた。自生の無症状ヤマユリからはいずれもウイルスは検出されなかった(第6図)。

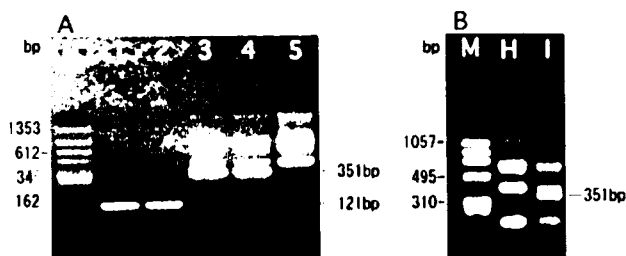
3. RT-PCRによるBPYVの検定

BPYVは汁液接種できず、かつ肺部局在性でウイルス濃度が低いため、免疫学的手法による検出も難しいことから、BPYVについてRT-PCRによる検出について検討した。

BPYVゲノムの塩基配列の情報に少なく、HSP70様タンパク質をコードする遺伝子配列について2件のみデータベースに登録されているだけであるが、この塩基配列情報をもとに2組、4種のプライマーを設計した(第1表)。これら2組のプライマー組み合わせを用いて、当所圃場において黄化病の病徴が認められた露地栽培メロン及びキュウリの葉から全RNAを抽出し、RT-PCRを行った。対照としてグロスチャンパー内で生育させた健全植物を用いた。その結果、病徴を示す葉からは、それぞれのプライマーについて目的とする大きさの増幅DNA産物が認められたが、bpyv-U127とL127プライマー組み合わせを用いてRT-PCRを行った場合、健全植物からも複数のDNA断片が増幅された(第7図)。しかし、これらのDNA断片は、カボチャやこの他に供試した各種植物からも検出されたが、感染ウイルスから増幅される断片より分子量が大きいので、ウイルス検定の判定には影響しなかった(第7図)。また、病徴を示すメロン葉から得られた目的とする大きさの増幅DNA産物の塩基配列とデータベース上の2種類のBPYV-HSP70様タンパク質遺伝子配列(Y15568及びU67447)とを比較したところ、それぞれ96.0及び98.5%の極めて高い相同性を示した(第8図)。

考 察

植物ウイルス病の発生状況を把握し、その拡大を予防するための的確な防除対策をとるためには、原因となるウイルス病の診断及び病原体ウイルスの同定は極めて重要である。従来、診断・同定には生物検定あるいはELISA等による免疫学的手法が用いられてきたが、いずれも時間と労力を要するため、現地からの緊急な要望に十分対応できないという問題点があった。このような状況の中で、近年開発されたRT-PCRは、ウイルスゲノムRNAの逆転写により得られるcDNAをPCRにより増幅することにより、植物体内に存在するごく微量のウイルスを高精度で検出することのできるすぐれた手法である。本研究では、実際に100分子程度のRNAが存在すれば検出できることを明らかにし、RT-PCRによるウイルスの検出法が農業現場に即した植物ウイルス病の診断及び病



第7図 BPYV *HSP70*様配列に設計したプライマーを用いたメロン黄化病ウイルスの検出

A: レーン1~4は病徴の認められるメロン葉より抽出したRNA及び5は健全メロンより抽出したRNAを鋳型に、レーン1及び2は、bpyv-U126とbpyv-L126(目的のDNA増幅産物は121bp)を、また、レーン3~5はbpyv-U127とbpyv-L127(目的のDNA増幅産物は351bp)をそれぞれ用いたRT-PCR産物。Mは ϕ X174/*Hinc* II サイズマーカーを示す。B: 健全キュウリより抽出したRNA(H)及び感染キュウリ葉より抽出したRNA(I)をそれぞれ鋳型としたときのRT-PCR産物、いずれもbpyv-U127とbpyv-L127(目的のDNA増幅産物は351bp)を用いた。Mは ϕ X174/*Hae* III サイズマーカーを示す。

原ウイルスの同定として利用可能であることを明らかにした。

植物ウイルスのRT-PCRを簡易な検定法とするためには、本操作において最も複雑なRNA抽出過程をどこまで簡易にできるかがポイントになる。そこで、CMV感染葉の葉片を蒸留水に浸漬しその溶液を用いてRT-PCRを行ったところ、ウイルスを安定して検出することができた。また、ウイルス感染葉から全RNAをある程度の段階まで精製した場合は検出可能であったが、粗精製の段階ではRT-PCRによるウイルスの検出はできなかった。植物からの抽出物にRT-PCRの反応を阻害する因子が存在することが考えられ(Rowhaniら 1993)、この点を解決することで、今後、安定したウイルスの検出が可能になると思われる。また、葉片浸漬法はすべてのウイルスを検出できるわけではないが、簡易でかつ高精度にウイルスを検出できることから、本法はCMV等の主要なウイルスの実用的検定が可能であることが示された。一方、葉片浸漬法では検出できなかったキクのTSWVについては、ELISA検定でもウイルスの検出は不安定であり、植物体内のウイルス濃度が低いと考えられるが、組織中に存在するTSWVがRT-PCRによる検出限界濃度以下であるとは考えにくいことから、前述した植物側に存在する何らかのRT-PCR阻害因子が関与している可能性も否定できない。今後、これらの点を明らかにし、より汎用性の高いウイルス検出手法の開発を進める予定である(Thomson and Dietzgen 1995)。

重複感染した植物からウイルスの検出を行う場合、従

来の方法ではいずれも操作が複雑であるため、迅速な対応が極めて難しい。マルチプレックスRT-PCRにより2種類のウイルス-植物の系で検討したところ、異なるウイルスに重複感染した植物から、1回のRT-PCR反応によって2~3種類のウイルスを検出することができた。本法を実用化するためには、マルチプレックスPCRそのものに障害がないかについて、プライマー組み合わせ及び鋳型の塩基配列についての十分な解析を行う必要がある。この作業には時間を要するものの、これまでの検定法では複数回の操作が必要であるのに対して、少なくともダイコンに重複感染したCMV及びTuMV、ヤマユリに感染したCMV、TBV及びLSVについては本法を用いて1回の検定操作で、同時に感染ウイルスを検出することが判明した。今後、さらに多くの植物-ウイルスの系での検討を進め、使用できるプライマー組み合わせと植物のデータを蓄積することによって、種々の植物-ウイルスの系において実用的な検定方法が開発されるものと期待される。

本研究において、RT-PCR法がこれまでのウイルス検定法では検出が困難であった師部局在性のBPYVについても適用できることが示された。すなわち、黄化病の病徴が認められるメロン及びキュウリ葉から、本研究で設計したbpyv-U127、bpyv-L127のプライマー組み合わせを用いることにより、安定してBPYVを検出することができた。しかし、このプライマー組み合わせでは、健全植物にも目的とするサイズとは異なるものの、常に一定の大きさのDNA断片が増幅された。これは、ほとんどの生物が持っている*HSP70*タンパク質遺伝子と相同性の高い*HSP70*様タンパク質がコードされているBPYVゲノム領域にプライマーを設計したためと考えられる。そのため、このプライマー組み合わせを用いたRT-PCRにより、健全なメロンから増幅されてくるDNA断片は、他のほとんどの植物からも増幅されてくるものと予想される(Borkら 1992)。RT-PCRで植物ウイルスの検定を行う場合に最も重要なことは、RT-PCR反応に適応したRNA試料が調製されていることである。健全植物でこの*HSP70*様遺伝子断片が増幅されれば、RT-PCR反応そのものが順調に進行したことを間接的に示すこととなり、この増幅DNA断片の存在により、検出精度の高い検定が可能となる。

以上のように、RT-PCRは植物ウイルスの検定法としてまだいくつかの問題点はあるものの、現場に即した実用的利用が可能で、他にもさまざまな利用や応用も可能なすぐれた手法である。日本植物病理学会では、植物ウ

A

[96.0% / 101 bp]

```

1st                                     ATGGCACACGCGCAAGAAGA-
                                     *** *****
2nd GACAAAGACCTGAGATGTTCAGTGTCTTTTGGGTGTTCAATGCAGCACGCGCAAGAAGAT

1st TCCGGATCGATGATTTACATTGACTGTAATTCTCATCCGTTGATGGATCTTACTCTTTTT
   *****
2nd TCCGGATCGATGATTTACATTGACTGTAATTCTCATCCGTTGATGGATCTTACTCTTTTT

1st GGCAACCCAAAAGTCGTCGT
   *****
2nd GGCAACCCAAAAGTCGTCGTGCGGAAACCTATGTCGATACCGTACTCAACTTCGCACTCG

```

B

[98.5% / 331 bp]

```

1st                                     CGACGAACTTCCTTGNGATAAAAGA
                                     **** *****
2nd TTTTGTGATCTCAACGATGGGTTGGTGGTGACGCGACCAACTTCCTTGT-GATAAAAGA

1st GAAAAACAAACCGCTTTATGNCGTGAAATTAGTAGGGAATGATGTCTATTTAACTGGTGT
   *****
2nd GAAAAACAAACCGCTTTATGTCGTGAAATTAGTAGGGAATGATGTCTATTTAACTGGTGT

1st GAACAAGGGTTTCTCTTGACCTATACAGTCAAACAACTCATTCTTCTATTTATTGATAC
   *****
2nd GAACAAGGGTTTCTCTTGACCTATACAGTCAAACAACTCATTCTTCTATTTATTGATAC

1st GATGGTAAGGTTGTTTTCAAAAACAAATAATTTAAATATTATTAGTCTTAATGTCTCTGT
   *****
2nd GATGGTAAGGTTGTTTTCAAAAACAAATAATTTAAATATTATTAGTCTTAATGTCTCTGT

1st CCCGGCAGATTATAAGTGCAAACAACGAATGTTTCATGAAATCAGTTTGTGATTCGTTGAA
   *****
2nd CCCGGCAGATTATAAGTGCAAACAACGAATGTTTCATGAAATCAGTTTGTGATTCGTTGAA

1st CTTTTCACTCCGGAGAATAATTAATGAACCGTCTGCAGCAGCGATTTATCCGTCTCAA
   *****
2nd CTTTTCACTCCGGAGAATAATCAATGAACCGTCTGCAGCAGCGATTTATCCGTCTCAA

1st GTCCC
   ***
2nd GTACCCGCAGCACAAATTATTTATAATGTATGACTTTGGTGGCGGTACTTTCGACACGTC

```

第8図 メロン黄化病感染葉からのRT-PCRによる増幅DNA産物の塩基配列とデータベースに登録されているBPYV *HSP70*様遺伝子部分の塩基配列の比較

1st:メロン黄化病ウイルス感染葉からのRT-PCRによる増幅産物の塩基配列。2nd:データベースに登録されているBPYVの*HSP70*様遺伝子部分の塩基配列。A:bpyv-U, L126プライマーを用いたRT-PCRにより増幅されたDNA産物の塩基配列とデータベース「Y15568」に登録された塩基配列の61~240番目部分の相同性。B:bpyv-U, L127プライマーを用いたRT-PCRにより増幅されたDNA産物の塩基配列とデータベース「U67447」に登録された塩基配列の181~660番目部分の相同性。下線を引いた部分が製作したそれぞれのプライマーの位置を示す。

ウイルスの検出やウイルス系統を的確に判別できるプライマー組み合わせのデータベース化を進めており、今後、本法はウイルスの主要な検定手法となるものと期待される。

引用文献

- Boccard, F. and D. Baulcombe. 1993. Mutational analysis of cis-acting sequences and gene function in RNA3 of cucumber mosaic virus JOURNAL Virology 193:563-578.
- Bork, P., C. Sander and A. Valencia. 1992. An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, action and HSP70 heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7290-7294.
- Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, J. E. Ranier, P. N. Ngyen and C. T. Caskey. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucl. Acids. Res. 16:11141-11156.
- Citation P. de Haan, L. Wagemakers, L. Peters and H. Goldbach. 1990. The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. J. Gen. Virol. 71: 1001-1007.
- Dekker, E. L., A. F. Derks, C. J. Asjes, M. E. Lemmers, J. F. Bol and S. A. Langeveld. 1993. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower-breaking JOURNAL J. Gen. Virol. 74:881-887.
- Hauser, S., C. Weber, G. Vetter, M. Stevens and O. Lewaive. 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. J. Virol. Methods 89:11-21.
- Hayakawa, T., M. Mizukami, M. Nakajima and M. Suzuki 1989. Complete nucleotide sequence of RNA 3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: comparative study of nucleotide sequences and amino acid sequences among CMV strains O, Q, D and Y JOURNAL J. Gen. Virol. 70:499-504.
- 池尾一穂. 2001. 配列に共通のパターンを探る. 蛋白質・核酸・酵素 46: 1299-1305.
- 今西規・宮崎智. 2001. 既知の配列と比較する: 相同性検索. 蛋白質・核酸・酵素 46: 856-862.
- Lee, C. C., X. W. Wu, R. A. Gibbs, R. G. Cook, D. M. Muzny and C. T. Caskey. 1988. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of urate oxidase. Science 239:1288-1291.
- Liu, H.-Y. and J. E. Duffus. 1990. Beet Pseudo-Yellows Virus: Purification and Serology. Phytopathology 80:866-869.
- Maiss, E., L. Ivanova, E. Breyel and G. Adam. 1991. Cloning and sequencing of the S RNA from a Bulgarian isolate of tomato spotted wilt virus JOURNAL J. Gen. Virol. 72:461-464.
- Nitta, N., C. Masuta, S. Kuwata and Y. Takanami. 1988. Comparative studies on the nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA3 between Y strain and Q strain JOURNAL Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 54:516-522.
- 大貫正俊・花田薫. 1996. RT-PCR法を利用したサツマイモ病の高感度簡易診断. 植物防疫 50:102-105.
- Owen, J., M. Shintaku, P. Aeschleman, S. Ben Tahar and P. Palukaitis. 1990. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3 JOURNAL J. Gen. Virol. 71: 2243-2249.
- Rowhani, A., C. Chay, D. A. Golino and B. Falk. 1993. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. Phytopathology 83:749-753.
- 佐野輝男. 1990. PCRによる植物病害の遺伝子診断. 植物防疫 44:557-561.
- Takamatsu, S., B. Lin, H. Furuta and K. Makara. 1994. RT-PCR mediated cloning and sequence analysis of lily symptomless virus coat protein gene JOURNAL Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 60:487-490.
- Thomson, D. and R. G. Dietzgen. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. J. Virol. Methods 54:85-95.
- Tian, T., V. A. Klaassen, J. Soong, G. Wisler, J. E. Duffus and B. W. Falk. 1996. Generation of cDNA specific to lettuce infectious yellows closterovirus and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homolog Molecular Plant Pathology 86:1167-1173.
- Vaira, A. M., L. Semeria, S. Crespi, V. Lisa, A. Allavena and G. P. Accotto. 1995. Resistance to tospoviruses in Nicotiana benthamiana transformed with the N gene of tomato spotted wilt virus: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. Mol. Plant Microbe Interact. 8:66-73.
- Yamashita, S., Y. Doi, K. Yora and M. Yoshino. 1979. Cucumber yellows virus: Its transmission by the greenhouse whitefly Trialeurodes vaporariorum Westwood, and the yellowing disease of cucumber and muskmelon caused by the virus. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 45:484-496.